PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number:

01-300889

(43) Date of publication of application: 05.12.1989

(51)Int.Cl.

C12N 1/20 // C12N 15/00

(21)Application number: 63-132000

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing:

30.05.1988

(72)Inventor: IKURA KOJI

SASAKI RYUZO CHIBA HIDEO

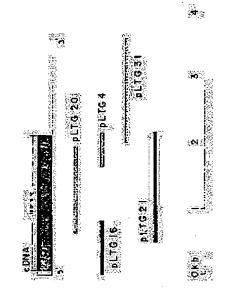
(54) TRANSFORMANT AND PRODUCTION OF MTGASE USING SAME

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A microorganism such as Escherichia coli transformed by a plasmid containing gene coding guinea pig liver transglutaminase (MTGase).

USE: For production of MTGase to modify nutrient value or physical properties by introducing various amino acids into food proteins so as to form covalent bond.

PREPARATION: For example, from clones from plural Escherichia coli containing the partially duplicate CDNA of MTGase, plasmid pLTG 16 and plasmid pLTG 21 are extracted and cut with a relevant restriction enzyme, and the resultant DNA fragments are fractionated by agarose electrophoresis followed by conjunction of the DNA fragments in the translational region coding MTGase using DNA ligase to produce a plasmid containing gene coding MTGase. Thence, this plasmid is incorporated into Escherichia coli to transform this Eschrichia coli followed by culture of the resultant microorganisms, thus obtaining the objective recombinant MTGase.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

	, '	
	Total Control of the	

[Date of extinction of right]

Colored Statement Statement Control

__1___.

訂正有り

⑲日本国特許庁(JP)

⑩ 特 許 出 願 公 開

◎ 公 開 特 許 公 報 (A) 平1-300889

⑤Int. Cl. ⁴

識別記号

庁内整理番号

❷公開 平成1年(1989)12月5日

C 12 N 1/20 // C 12 N 15/00 G-8515-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

◎発明の名称 形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

②特 顕 昭63-132000

②出 願 昭63(1988) 5月30日

特許法第30条第1項適用 昭和63年4月2日 社団法人日本農芸化学会開催の「昭和63年度日本農芸 化学会大会」において文書をもつて発表

@発 明 者

伊倉

宏 司

京都府八幡市八幡山田26-1

隆造英雄

京都府京都市左京区田中東高原町14 京都府宇治市広野町新成田100-131

⑪出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 紅紅 古

1. 発明の名称

形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造 法

2. 特許請求の範囲

(i) モルモット肝トランスグルタミナーゼ (以下MTGaseと略す) をコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物。

(2) 微生物がエシェリヒア・コリである請求項(1)記載の微生物。

(3) 請求項(1)又は(2)項記載の微生物を培地中で培養して目的とするリコンピナントMTGaseを生産させ、該リコンピナントMTGaseを培地中から採取することを特徴とするリコンピナントMTGaseの製造法。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明はNTGeseをコードする遺伝子を含有する プラスミドにより形質転換された微生物及び複微 生物によるリコンピナントNTGeseの製造法に関す る。

<従来技術>

モルモット肝トランスグルタミナーゼ(Protein relutamine: amine: r-glutamyltransferase. BC2.3.2.13、以下TGase と略する)はタンパク質の修飾酵素の一つであり、Ca²¹依存性のアシル転移酵素である。基質としては、アシル供与体としてペプチド額中 Gla残基のr-カルボキシアミド基が、アシル受容体としてアミン化合物の第1級アミノ基やペプチド鎖中 Lys残基のェーアミノ基がモれぞれ反応する。

商、反応機構は以下のとおりである。

即ち、この酵素が触媒する反応としては、ペプチド額中 Gla残基とペプチド額中 Lys残基との間での e - (r - グルタミル) リジン架橋結合の形成、ペプチド額中 Gla残基へのアミン化合物の導入、あるいはアミン化合物非存在下でのペプチド額中 Gla残基の脱アミド反応である。

このTGase は多くの動物の様々な部位で見つけられているが、この生理機能として知られているものはほとんどがタンパク質間架橋形成反であり、血液凝固カスケード反応の最終ステップであるフィブリンモノマーの架橋重合による安定化、表皮組織の角質層における不溶性タンパク質の形成、モタンパクの架機形成、などである。

TGase を利用すれば、蛋白質の生化学的研究、 新しい酸素反応系の形成や、再利用可能な補酵素 誘導体 - カゼイン複合体の形成、さらには必須ア ミノ酸を導入することによって食品蛋白質の栄養 傷を改善することができ、従って大量入手する方 法の開発が望まれている。

さて、現在TGase を利用するにあたって良質な

酵素の給源としてモルモットの肝臓のIGase (以 下MIGaseと略する)が用いられている。

反応機構

しかしながら、HTGaseは質的には良好であるが、 モルモット肝臓が供給源であることより取得でき る量が限られていること、及び特製法が非常に複 雑で収率が極めて悪いこと、更にはモルモット自 体が非常に高価であることなどの欠点がある。従 って、以前よりHTGaseを大量に、しかも安価に更 には簡便に生産する方法の提供が望まれていた。 <本発明が解決しようとする課題>

本解明が解決しようとする課題は、遺伝子工学的手法を用いて、微生物から大量に目的とするリコンピナントHTGaseを生産する方法の提供にある。

本発明者等は上記課題を解決すべく銭倉研究を 行った結果、NTGaseをコードする遺伝子を含有す るプラスミドにより形質転換された微生物を培養 することにより、目的とするリコンピナントNTGase を多量に生産せしめることができ、本発明を完成 に至らしめた。 即ち、本発明は、ATGaseをコードする遺伝子を合有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンピナントATGaseの製造法である。

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明者等は既にNTGaseの部分重複CDNAクローンを複数個取得しており(第1図金)、これから
NTGaseをコードするDNA 配列及びNTGaseのアミノ酸配列を決定している(Agric. Biol. Chem.51(3)。
957-961 頁(1987年))これによると、MTGaseをコードするDNA は、開始コドン(ATG) と690残基のアミノ酸からなるコドンを含むものである(第2図金)。また本酵素の分子量は76.620と算定されている。さて、NTGaseを生産する微生物の調製であるが、まず、MTGaseを生産する微生物の調製であるが、まず、MTGaseをコードする遺伝子を微生物内で複製可能なプラスミドに組み込む。この時、MTGaseをコードする遺伝子を発現ベクターのプロモーター配列下波に挿入すればよい。

組み込む方法は、プラスミドを適当な制限酵素で切断し、その切断部位に目的とするMTGaseをコ

___3___

特開平1-300889(3)

ードする遺伝子を挿入し、接続すればよい。このようにして得られた組み換えDNA を原核生物宿主に導入し、得られた形質転換微生物の中からMTGaseを生産する株を選べば良い。本発明において、組み換えDNA が導入される微生物宿主としてはエシェリヒア・コリ、バチルス・ズブチリス等を用いることができるが、好ましくはエシェリヒア・コリを用いるのが良い。

また、本発明に用いることができるエシェリヒア・コリ用ベクターとしてはBRタイププラスミドベクター (リラックス型)、BKタイププラスミドベクター (ストリンジェント型)、 X giタイプファージベクター等々の種々のベクターを用いることができる。

またプロモーターとしては trpプロモーター、 lac プロモーターを初めとするエシェリヒア・コ リ中で機能するすべてのプロモーターが利用可能 である。

組み換えDNA を用いた宿主細胞の形質転換には、 通常よく用いられる次の方法がある。エシェリヒ

培養菌体より、リコンピナントMTGaseを採取するには、通常以下のような方法で行えば良い。

即ち、培養菌体を市却遠心機等で集留した後、 適当なパッファーに懸濁し、超音波あるいはダイ ノミルなどで菌体を破砕して抽出液を得る。この 菌体抽出液を破安沈毅分画法、イオン交換クロマ トグラフィー法、ゲル沪過法、抗体カラム法など を行ってリコンピナントMTGaseの特製環品が得ら れるわけである。

(効果)

本発明はモルモットの肝臓が保給液である為に
①少量しかNTGaseを提供できない、②高価である、
②特製操作が非常に煩雑である等の従来法の欠点
を解消し得る質期的な方法である。換含すれば、
本発明の方法を用いると、大量に、しかも、安く、
更に、簡便にNTGaseを提供し得るのである。

このようにして得られたリコンピナントMTGase は従来の天然型MTGaseと同様に、各種アミノ酸を 食品蛋白質に共有結合的に導入することにより、 栄養価や物性を改変することができる。また、本 ア・コリの如き原核生物が宿主の場合、このDNAを取り込むことの出来るコンピテント細胞は対数増殖期における細胞を回収後、良く知られているCaC & 注によって形質転換できる。形質転換反応被中に MaC & 』又は RbC & を共存させれば形質転換効率は向上する。また宿主細胞のプロトプラスト掲製後形質転換させることも可能である。

形質転換された微生物を培養する培地および培養方法は通常の培地、方法でよい。すなわち培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要に応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する適常のものである。

炭素源としてはグルコース、シュクロース等及びこれらを含有する識粉加水分解物、糖密等が用いられる。窒素源としてアンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。より好ましくはペプトン、トリプトン、肉エキス、酵母エキス等の天然素材なども使われる。

培養は好気的条件下で培地のpH及び温度を適宜 調節しつつ行なえば良い。

酵素は食品以外の医薬品、化成品への応用も期待 できる。

以下、本発明を実施例に従って説明する。 【実施例1:発現プラスミドpktG1の構築】

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAのクローン5個を取得しており(第1図参)、またこれを基にDNA 配列及びアミノ酸配列を決定している(第2図参)。

さて、まず第1図に示したプラスミドpLTG 1 6 を含有するエシェリヒア・コリMC1061 (以下、B. coli MC1061 とする) 及びプラスミドpLTG 2 1を含有するB.coli MC1061 より以下の方法に従ってプラスミドpLTG 1 6 及びプラスミドpLTG 2 1 を抽出した。

即ち、培養被 1 0 0 m 2 を遠心分離により関体のみ集め、5 0 mHtris - HC 2 , pB 7.5 の 5 m 2 に 整衡し - 8 0 でに凍結後、融解して次にリゾチーム (最終濃度、2 m 2 / m 2) を加えて 0 でで 1 0 分間静置し、さらにBDTA (最終濃度 0.1 M) を加え、0 でで 1 0 分間静置する。その後、Triton X

_---4

特開平1-300889(4)

その後0.2 容の5 M NaC & と 1/3 容のポリエチレングリコールを加え、0 でに 6 0 分間静置後、10.000rpm 2 0 分間、遠心分離によりDNA 沈殿を回収する。

次にこの沈殿を3.8 m & の水に溶解し、4 g の CsC & を加えて溶解後、1 0 m g / m & の EtBr の 200 μ & を加えて40.000 rpm 、1 6 時間、2 0 で 超 遠心分画を行う。

1621 A を調製した。

ii) <u>プラスミド pLTG 1621 B の構築</u>

- (イ)上記i)で得たプラスミドpLTG1621Aを制限酵素 Sal I 及びHind II で切断し、アガロース電気泳動分画により小さいDNA断片(約1440bp)を回収した。
- (ロ) プラスミドpLTG 2 1 を制取酵素Lind 回及び BcoRI で切断し、アガロース電気泳動分画に より、小さいDNA 断片(約7 4 0 bp)を回収 した。
- (ハ) ブラスミド pUC9 (ファルマシア社製)を 制限酵素 Sall及びEcoRI で切断し、アガロ ース電気泳動分画により、大きなDNA 断片を 回収した。
- (ニ)上記(イ), (ロ), (ハ)で得たDNA断 片をDNAリガーゼで連結させて、プラスミド pLTG1621Bを構築した。

單) <u>プラスミドpDTG1の構築</u>

(イ) 上記 ii)で得たプラスミドpLTG1621 B を制 限酵素 Hco I 及びBstE II で切断し、アガロー

プラスミドpLTG 1 6 及びプラスミドpLTG 2 1 よりMTGase発現プラスミドpKTG 1 を構築した(第 3 及び 4 図)。以下に、その詳細を示した。

i) <u>プラスミド pLTG 1621 A の構築</u>

- (イ) さて、プラスミドpLTG 1 6 を制限酵素Base I、 Bind E で切断し、アガロースゲル電気泳動分 画により大きい方のDNA 断片を回収した。尚 第 3 図及び第 4 図において制限酵素で切断し たDNA 断片の内、使用したDNA 断片は破壊で 示した。
- (ロ) プラスミドpLTG 2 1 を制限酵素 Bsml及び Bind m で切断し、アガロースゲル電気泳動分 西により、約7 4 0 bpのDNA 断片を回収した。
- (ハ) 上記(イ) 及び (ロ) で得たDMA断片をDMA リガーゼを用いて連結させ、プラスミドpLTG

ス電気泳動分画により約370bpのDNA 断片を回収した。

- (ロ)上記ii)で得たプラスミドpLTG1621Bを制限酵素8stBI及び Sali で切断し、アガロース電気泳動分質により小さい方のDNA断片(約1700bp)を回収した。
- (ハ) プラスミド pUC 118N (京大、ウィルス研 牧先生より分譲された) を制限酵素、Nco! 及び Sal!で切断し、アガロース電気泳動分 酒により、大きい方のDNA 断片を回収した。
- (二) 前記(イ)。(ロ)。(ハ)で得たDNA断 片をDNAリガーゼにより連結させてプラスミ FpUTG1を構築した。

iv) <u>プラスミドpKTG1の構築</u>

- (イ)上記録)で得たプラスミドpBTG 1 を制限酵素 Nco I 及びBatB E で切断し、アガロース電気泳動分画により約37 0 bpのDNA 断片を回収した。
- (ロ) 上記章) で得たプラスミドpUIG 1 を制限酵素BastE II 及び Pat I で切断し、アガロース電

特開平1-300889(5)

気泳動分画により小さい方のDNA断片(約1700 bp) を回収した。

- (ハ) trc プロモーター (trpプロモーター及び lac プロモーターの融合したもの) 及びアン ピシリン抵抗性を有するプラスミドpKK233ー2(ファルマシア社製) を制限酵業 Nco I 及び Pst I で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きな DNA断片を回収した。
- (二)上記(イ)、(ロ)、(ハ)で得たDNA 断 片をDNA リガーゼを用いて連結させてMTGase 発現プラスミ F p XTG 1 を複築した。

即ち、以上の操作を処することにより、2種類の 重複するcDNAを有するプラスミドpLTG 1 6 及び pLTG 2 1 からMTGaseをコードする全DNA 配列 (関 始コドンATG から終止コドンTAA まで)を含有す るプラスミドpKTG 1 を構築したわけである。

(実施例2 大腸菌によるリコンピナントMTGaseの生産)

i) 実施例1で作成した

プラスミドpKTG 1 を保持するエシェリヒア・コ

果は第5図に示した。

これからも分るようにプラスミドpKTG 1 を含有するエシェリヒア・コリJM103株(FBRM P - 10008)は関体内にリコンピナントMTGaseを生産していた。

ii)上記i)により歯体内にMTGase蛋白が生産されていることを確認したので、このリコンピナントMTGaseを以下の方法で歯体より抽出した。即ち、上述の整濁液にソニック処理(20キロサイクル、300秒)を行ない、抽出した。

この抽出液はトランスグルタミナーゼ活性を示した(第6図)。尚、コントロールとして、プラスミドpKK233-2 で形質転換したエシェリヒア・コリJM103 株より同様の方法で抽出した抽出液を用いた。

第6図より分るようにNTGaseはCa²⁺依存性酵業であるので、Ca²⁺が存在しないと、たとえ PERM P -10008の抽出液であってもトランスグルタミナーゼ活性は示さない。

尚、トランスグルタミナーゼ活性の測定は以下 の方法で行った。 リJH 103株 (FERM P-10008) を50 μg/ml アンピシリンを含む2 YT培地 (1.6 %パクトト リプトン、1.0 %酵母エキス、1.0 % NaCl. pH 6.7) 1.0 l中で37で、12時間培養した。

その後、誘導剤として、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG) 0.2 m & 添加して 5 時間培養した。培養菌体を遠心分離により集菌し、0.15 M RC & 2 m M EDTA, 0.2 m M DTTを含む 2 0 m H トリスー塩酸緩衝液 (pB 7.5) で洗浄した後、同じ級衝液 3 0 m & に熱濁した。

この集團菌体の一部をとり、1% SDSで溶図し、その抽出液の1部を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。コントロールとして、モルモット肝より特製したMTGase模品及びプラスミドPKK233-2 で形質転換されたエシェリヒア・コリJM103 株を用いた。

この電気泳動したアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜に写しとり、抗MTGase抗体で反応させた後にパーオキシダーゼを結合した2次抗体と反応させた。このウェスタンプロッティングの結

5 mg/ m ℓ アセチルα:,, - カゼイン, 0.13 mM (3 H) プトレシン, 5 0 mMトリスー塩酸 (pR7.5)、5 mM CaC ℓ: 1 0 mM DTTおよび抽出液を含む反応液 (1 5 0 μ ℓ) を3 7 ででインキュベートしー定時間ごとに一定量の反応液 (2 0 μ ℓ) をベーパーディスク上でスポットする。未反応の (3 H) プトレシンをトリクロール酢酸で洗浄した後に、ペーパーディスク上に固着したアセチルα:, - カゼインに取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで測定した。

(L. Lorand et al.: Anal. Biochem., <u>50</u>, 623 -631 (1972)) に基本的にしたがっている。

【実施例 3 モノクロナール抗体カラムによるリコンピナントNTGaseの精製】

実施例 2 ii)で得た抽出被 3 0 m & を抗MTGase モノクロナール抗体カラム (1.4 cm × 6 cm) にア プライした。

TBS バッファー (2 0 mHトリスー塩酸(pH 7.5)、 0.15 M RC &、0.2 mM DTT, 2 mM EDTA)1 0 0 m & で洗浄した後、溶出バッファー (2 0 mM NaHCO。 6

特開平1-300889(6)

- NaOH (pH 1 0.4) 、 0.4 mM DTT、 2 mM EDTA 、 2 M KC &) 4 0 m & で目的とするリコンピナントMTGaseを溶出した。

溶出液を 2 0 m 4 のカウンターバッファー(1 M トリスー塩酸 (pH 7.5, 0.4 mM DTT, 2 mM BDTA) で中和した。

その後、限外辺過処理を行うことにより、精製リコンピナントNTGaseを得た。

確認の為に SDS-PAGEを行ったところ均一なパンドが得られた。この単離したリコンピナント MTGaseのトランスグルタミナーゼ活性を測定すると、その比活性は1690ユニット/mg×10°であった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、MTGase CDNA の翻訳領域及び、各遺伝子領域を含むクローンを示す。

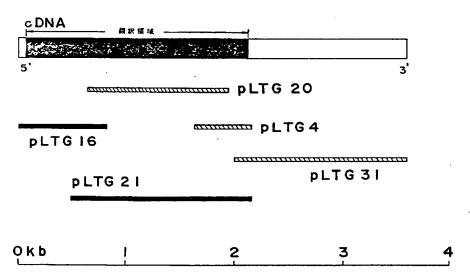
第2図はMTGaseのアミノ酸配列及びMTGaseをコードするDNA 配列を示す。

第 3 図はプラスミ FpLTG1621 B の構築図を示す。 第 4 図はプラスミ FpETG 1 の構築図を示す。 第 5 図はプラスミドpETG 1 により形質転換させ たエシェリヒア・コリJMIO3 株(PERM P - 10008)

のウェスタンブロッティングを示す。

第6図は培養した FERM P-10008 抽出液のトランスグルタミナーゼ活性を示す。

第 1 図



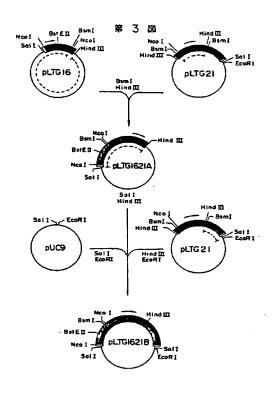
特開平1-300889(フ)

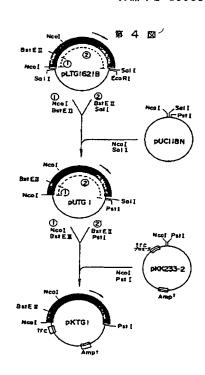
第 2 関

ate ces ele est ete ate ete ele als ser ele te ele ete effe 13 etc sir etc cet eile cite cet sie etc elle ete ete elle 155 ele che che the the che che che che che che the ple eo etr ete alic elic cla eltr clir altr ele ele elic elic altr alle sign ri che rie the the the air etr ete ele ele ele ele tie rie the tos ace cha etr els ete che atr che ete sis ete che ate ete effe ace the als els she che che the ale the eta che ale che 175 ate che che sale che che che che che che che che she she she she she ese rès ale cla ele cle cle cle tir ete che ale cla ele gig 155 The afte the ele ele the the ale aft ele aft ele aft ele aft ele aft are the ege ere att ere est ege upe ege up up age ese est 195 ctc rite ale ale ale etc ale rite che ale air ale ale che cla gig 210 the rie che che ale ala che ele the ele che che ele aff ete ale ete ale tée dir ele els che ete ets che che eda que see est aic aic ric uir eir etr etr ait ett aft ett aft ett aft ers are ele ele are ere ele ele ele ele ala ele ele ele ere ele ele 270 cete ale ale ale cete ale ace ate ete eta eta eta ete gig ada ete ete ele rée etr ele ate ele ale ele ete ale ale

200 tit são tês sée cão são câs são são são ete ete sie cãs sije 250 ses efe ele ele sile sér els efe sés ric ric rée ris efe ets ₁911 275 che ett che ece ste ale ele ele che che ale ete ale ete ale the pli gil ers afe efe che she ste ser et ale ser efe ete ete elt elt gif ets che che sie ste che che ste rie ale the che che che rêt 1914 ase ele ele ela etr. efe etr ale ele ale ele eta alt ala 1915 ece ata ale cla ete ces cle che cha ate céa ete ce afe ite are etr ete ete ele ale ate atr ate ete atr ele rir ele atr 195 che ale ale alt elt alt elt ele ale ele ele ela the elle the rea che and are are obe ote ele ate ete rit ale ale Tie 252 cet ele ste ete ete ele ste ale ete ale ete ele ete ele ete ete spo ctr ate cle cle cle cle ale ale rit eta rte cle ale ale ale ale ses att afte ete ele alt eta ela ate ate ete ete ete ete ete ele ele ete ale cle ale ce ale cte at ce ete ete ete ete ale 1873

特開平1-300889(8)





第 6 図

